

09/508418

PCT/JP98/04064

日本国特許庁 10.09.98
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1997年 9月11日

REC'D 30 OCT 1998

WIPO

PCT

出願番号
Application Number:

平成 9年特許願第265084号

出願人
Applicant(s):

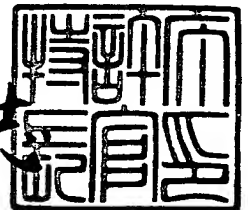
日本農薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1998年10月16日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平10-3082243

【書類名】 特許願

【整理番号】 P70

【提出日】 平成 9年 8月11日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明の名称】 光要求型除草剤耐性新規プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ

【請求項の数】 23

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府河内長野市小山田町345番地 日本農薬株式会社 総合研究所内

【氏名】 堀越 守

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府河内長野市小山田町345番地 日本農薬株式会社 総合研究所内

【氏名】 豆塚 弘毅

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府河内長野市小山田町345番地 日本農薬株式会社 総合研究所内

【氏名】 廣岡 卓

【特許出願人】

【識別番号】 000232623

【郵便番号】 103

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋■丁目2番5号

【氏名又は名称】 日本農薬株式会社

【代表者】 村田 利和

【代理人】

【識別番号】 100094802

【郵便番号】 108

【住所又は居所】 東京都港区芝四丁目5番12号 三田ハイツ903号さ

へき国際特許商標事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 佐伯 健兒

【電話番号】 03-5484-4544

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9203561

【書類名】 明細書

【発明の名称】 光要求型除草剤耐性新規プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、又は該アミノ酸配列において1個または複数個のアミノ酸の欠失、付加あるいは置換等が認められるアミノ酸配列を有し且つ実質的にプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼと同等の酵素活性を有する変異ペプチドからなる光要求型除草剤耐性プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ、その誘導体。

【請求項2】 配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1個または複数個のアミノ酸が欠失し且つ実質的に同等の酵素活性を有する光要求型除草剤耐性プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ、その誘導体。

【請求項3】 配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、又は該アミノ酸配列において、トランジットペプチドが欠失し、さらに1個または複数個のアミノ酸の欠失、付加あるいは置換等が認められるアミノ酸配列を有し且つ実質的に同等の酵素活性を有する変異ペプチドからなる光要求型除草剤耐性プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ、その誘導体。

【請求項4】 配列番号2に記載のアミノ酸配列において、トランジットペプチドが欠失し且つ実質的に同等の酵素活性を有する光要求型除草剤耐性プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ。

【請求項5】 配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ。

【請求項6】 請求項1に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項7】 請求項2に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項8】 請求項3に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項9】 請求項4に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードす

る遺伝子。

【請求項10】 請求項5に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項11】 配列番号3に記載の塩基配列を有する遺伝子。

【請求項12】 請求項6に記載の遺伝子を含む組換えベクター。

【請求項13】 請求項7に記載の遺伝子を含む組換えベクター。

【請求項14】 請求項8に記載の遺伝子を含む組換えベクター。

【請求項15】 請求項9に記載の遺伝子を含む組換えベクター。

【請求項16】 請求項10に記載の遺伝子を含む組換えベクター。

【請求項17】 請求項11に記載の遺伝子を含む組換えベクター。

【請求項18】 請求項12に記載のベクターによる形質転換体。

【請求項19】 請求項13に記載のベクターによる形質転換体。

【請求項20】 請求項14に記載のベクターによる形質転換体。

【請求項21】 請求項15に記載のベクターによる形質転換体。

【請求項22】 請求項16に記載のベクターによる形質転換体。

【請求項23】 請求項17に記載のベクターによる形質転換体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、植物、特にタバコ由来の、光要求型除草剤に耐性なプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ、該タンパク質をコードする遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター並びに該ベクターによる形質転換体に関する。

【0002】

【従来の技術】

プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼは全生物に普遍的に存在するテトラピロール合成系において、プロトポルフィリノーゲン■をプロトポルフィリン■に変換する酵素である。本合成系により、微生物、動物においてはヘムが合成され、一方、植物ではヘムの他にクロロフィルが合成される。本酵素は光要求型除草剤の標的酵素と考えられているが、酵素の同定及び遺伝子の単離は最近まで全く

なされていなかった。1993年に大腸菌のhemGがプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子として初めて単離され (Sasarman, A. et al. (1993) Can. J. Microbiol. 39:1156-1161.)、1994年には枯草菌のhemYがプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子として単離された (Dailey, T. A. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:813-815.)。真核生物では1995年にヒトのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子がクローニングされ (Nishimura, K. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:8076-8080.)、同年にはマウスのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子もクローニングされた (Taketani, S. et al. (1995) Eur. J. Biochem. 230:760-765.)。植物においてはシロイヌナズナ及びトウモロコシのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子がクローニングされた (WO 95/34659)。また、シロイヌナズナ及びトウモロコシの光要求型除草剤耐性プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子も、大腸菌を用いたスクリーニング系によって、既に得られている。シロイヌナズナ及びトウモロコシ由来の光要求型除草剤耐性プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子 (WO 95/34659) は大腸菌を用いて選抜されており、このような遺伝子が植物細胞中で十分な活性を発揮しうるのか、又耐性の程度は充分であるのかは明らかではない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

光要求型除草剤耐性植物を遺伝子組換えで作出する場合、用いる遺伝子としては、高等植物由来の光要求型除草剤耐性プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子が有力な候補となる。他の生物由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ、例えば大腸菌のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼは他生物のものに比べて分子量が明らかに小さい等、構造的に大きく異なり、枯草菌のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼは可溶性である点が膜結合性の他の生物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼとは大きく異なる。また動物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼはトランジットペプチドを持たないにもかかわらずミトコンドリアに輸送されるという特殊な性質を持つ。このような各種生物由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの性質の違いから、光要求型除草剤耐性植物を遺伝子組換えで作出する場合、高等植物由来のものが望ましい。一方、単細胞

生物である*Chlamydomonas*由来の抵抗性遺伝子(WO 97/04088)はプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子であるかどうかは不明であり、高等植物に耐性を付与できるかどうかは明らかではない。望ましい遺伝子としては従って、植物細胞あるいは植物体を除草剤存在下で選抜し、該植物細胞あるいは植物体中の耐性型遺伝子が植物細胞中で十分な生物活性及び高度な光要求型除草剤耐性を保持していることを確認した後、該遺伝子を何らかの方法で単離したものと考えられる。

【0004】

従って、本発明の課題は、高等植物由来の、光要求型除草剤に高度に耐性なプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ、該酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター並びに該ベクターによる形質転換体を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、前記課題を解決すべく、高等植物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼについて鋭意研究を行った結果、植物細胞あるいは植物体を除草剤存在下で選抜し、該植物細胞あるいは植物体中の耐性型遺伝子が植物細胞中で十分な生物活性及び高度な光要求型除草剤耐性を有していることを確認した後、該遺伝子を特定の方法で単離するという手段を取った。具体的には前記課題を解決すべく、高等植物特にタバコのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼについて鋭意研究を行った結果、タバコ由来の、光要求型除草剤に耐性を示すプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの遺伝子のクローニング及び発現に成功した。本発明の遺伝子は新規であって、本遺伝子産物の光要求型除草剤に対する耐性度を、既に報告されているシロイヌナズナ由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの耐性度と比較したところ、両者の構造の高い類似性にもかかわらず、本遺伝子産物の耐性度が大いに勝っていることが明らかとなった。従って、前記課題は、本遺伝子を用いることによって解決することができる。

【0006】

本発明は、配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列、該アミノ酸配列において1個または複数個のアミノ酸の欠失、付加あるいは置換等が認められ且つ実質

的に同等の酵素活性を有する光要求型除草剤耐性を示す変異ペプチド、からなるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ、その誘導体又は変異体を提供する。さらに、配列番号2に記載のアミノ酸配列において、トランジットペプチドが欠失し且つ実質的に同等の酵素活性を有する光要求型除草剤耐性を示すアミノ酸配列からなるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼを提供する。

【0007】

配列番号2で示されるアミノ酸配列からなる本発明のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼは、実質的に同等の酵素活性及び光要求型除草剤に対する耐性を損なうことがないかぎり、前記のアミノ酸配列において1個または複数個のアミノ酸の欠如、付加あるいは置換等が認められる変異ペプチド、すなわち、自然界に発見される変異ペプチドまたは人為的に改変した変異ペプチドが含まれる。

本発明のポリペプチドは、葉緑体に存在する酵素と考えられている。一般に、葉緑体等の細胞内小器官に存在するタンパク質のほとんどは核のゲノムにコードされており、細胞質で翻訳された後、N末端に存在するトランジットペプチドと呼ばれる輸送シグナルの働きによって、これら細胞内小器官に輸送される。輸送された後、トランジットペプチドは切除され、成熟したタンパク質となる。従って、本発明のポリペプチドのN末端にもトランジットペプチドが存在すると考えられる。また、生物活性を発現する本質はトランジットペプチドを除いた部分（成熟タンパク質部分）にあり、トランジットペプチドは活性に関与しない。

従って、本発明にはトランジットペプチドを欠失した成熟タンパク質部分を包含する。

【0008】

またより詳しくは、本発明は配列番号3に記載の塩基配列、又は該塩基配列において1個若しくは複数個の塩基が付加、欠失若しくは置換されており且つ実質的にプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼと同等の酵素活性を有する光要求型除草剤耐性を示すプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子を提供する。

【0009】

また前記ポリペプチドをコードする本発明によるDNA配列には、目的のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼをコードするcDNA、イントロン及びエク

ソンを含む染色体DNA、同染色体DNAのイントロンを除去してエクソンを連結したDNA、さらには合成DNA法によって人為的に作製したオリゴヌクレオチドを連結して得た合成DNA等が含まれる。合成DNA法を用いて合成DNAを調製する際には、遺伝子コードの縮重により、アミノ酸配列を変化させることなく遺伝子の塩基配列を変化させることによって、目的の組み換えDNAを調製することができる。したがって本発明のDNAは、目的のポリペプチドをコードする遺伝子の縮重に基づく全ての塩基配列をも包含する。

【0010】

さらに、本発明は、前記の遺伝子を含む組換えベクター、前記のベクターによる形質転換体をも提供する。

【0011】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

植物細胞及び組織培養の一般的操作、あるいはmRNAの精製、cDNA、cDNAライブラリー、組換えDNAの作製、DNAの塩基配列の決定等の一連の分子生物学的な操作、あるいは植物の形質転換等の植物分子生物学的操作は、公知の実験書、それぞれPlant Cell and Tissue Culture, Vasil, I. K. and Thorpe, T. A. Kluwer Academic Publishers, 1994等、あるいはMolecular Cloning 2nd Edition, CSH Laboratory Press, Sambrook, J. et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Ausubel, M. et al.等、あるいはPlant Molecular Biology Manual, Gelvin, S. A. et al. Kluwer Academic Publishers, 1991, 1995(Second edition)等に従って実施することができる。

【0012】

1. 光要求型除草剤

本発明で用いられる光要求型除草剤とは、除草活性発現のために光を必要とする除草剤であり、光要求型除草剤を植物に処理すると、まず、細胞中の膜系が過酸化的に破壊され、次いで、地上部が白化し、ついには枯死する。光要求型除草剤処理細胞ではプロトポルフィリンIXが蓄積することが見いだされ(Matringe,

M. and Scalla, R. (1988) Plant Physiol. 86:619-622.)、その後の研究で、光要求型除草剤の標的酵素は、テトラピロール合成系においてプロトポルフィリノーゲン■をプロトポルフィリン■に変換するプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼであることが明らかとなった (Matringe, M. et al. (1989) Biochem, J. 260:231-235.)。現在では、光要求型除草剤の作用機作は以下のように考えられている。光要求型除草剤によって植物細胞中のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼが阻害されると、まず、基質のプロトポルフィリノーゲンIXが蓄積し、このプロトポルフィリノーゲンIXから、非酵素的に、あるいは細胞質中の光要求型除草剤非感受性の非特異的酸化酵素によってプロトポルフィリンIXが大量に生成される。このプロトポルフィリンIXが光存在下で光増感反応を引き起こし、大量の活性酸素が発生し、これが膜系を過酸化的に破壊し、植物を枯死に至らせる (Scalla, R. and Matringe, M. (1994) Rev. Weed Sci. 6:103-132.)。このような作用機作から、光要求型除草剤は、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (Protox) 阻害剤、ポルフィリン蓄積型除草剤とも呼ばれている。

【0013】

光要求型除草剤には多様な構造の化合物が属している。代表的なものとしては、ジフェニルエーテル系、オキサジアゾール系、ピリジン系、ピリミジン系、環状イミド系、トリアゾール系、ピラゾール系等がある (Scalla, R. and Matringe, M. (1994) Rev. Weed Sci. 6:103-132.)。

本発明の光要求型除草剤として望ましくは、トリアゾール系、ピラゾール系であり、最も望ましくはピラゾール系である。

【0014】

2. 光要求型除草剤耐性タバコカルの選抜

植物は、一細胞であるプロトプラストから細胞塊であるカルスを経て、再度完全な植物体に分化することができ、植物の持つこのような性質は分化全能性 (totipotency) と呼ばれている。また、植物の培養細胞の特徴として、それらの細胞が変異に非常に富んでいることが挙げられ、このような変異は体細胞変異 (somaclonal variation) と呼ばれている。従って、このような培養細胞を何らかの薬剤、例えば除草剤で選抜すれば、除草剤耐性細胞を得ることができ、さらに、

得られた除草剤耐性細胞は、分化全能性を利用して植物体まで再生させることができる。このような例としては、グリホセート耐性植物 (Singer, S. R. and McDaniel, C. N. (1985) *Plant Physiol.* 78:411-416)、スルフォニルウレア耐性植物 (Chaleff, R. S. and Ray, T. B. (1984) *Science* 223:1148-1151.) など、多くの例が知られている。しかし、培養細胞は培養を続けているうちには何らかの原因で、分化全能性を失っていることが多く、又、このような方法では除草剤耐性を異種の植物に導入するのは困難である。そこで、除草剤耐性細胞から除草剤耐性遺伝子を単離できれば、得られた遺伝子を既知の方法、例えばアグロバクテリウム法等で、様々な有用作物に導入することができる。そのような除草剤耐性遺伝子には、除草剤自体を分解する遺伝子、例えばプロモキシニル分解遺伝子 (Stalker, D. M. et al. (1988) *Science* 242:419-423.)、ピアラフォス分解遺伝子 (De Block, M. et al. (1987) *EMBO J.* 6:2513-2518)、除草剤によって生成される何らかの毒性物質を分解する遺伝子、例えばスーパーオキシドディスムターゼ遺伝子 (Furusawa, I. et al. (1987) *Plant Cell Physiol.* 25:1247-1252.)、除草剤耐性型標的酵素遺伝子、例えばスルフォニルウレア耐性型アセト酪酸合成酵素 (ALS) 遺伝子 (Lee, K. Y. et al. (1988) *EMBO, J.* 7:1241-1248.)、グリホセート耐性型5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) 遺伝子 (Comai, L. et al. (1985) *Nature* 317:741-744) 等が知られている。

【0015】

3. 培養細胞における除草剤耐性機構

前述した、除草剤耐性培養細胞における耐性機構としては、解毒機構の獲得、細胞内への薬剤の透過性の変化、標的酵素の過剰生産及び標的酵素の除草剤耐性型への変異等が考えられる。耐性がいずれの機構によるかを解明することは、除草剤が阻害する反応の前駆体の蓄積の有無、同じあるいは異なった作用機構を示す様々な構造の除草剤に対する耐性の比較、耐性細胞及び感受性細胞から標的酵素を抽出し酵素活性を比較すること及び選抜に用いた除草剤に対する標的酵素の感受性を試験管内で検討すること等によって推定できる。その結果、有用な除草剤耐性遺伝子を保有していることが明らかとなれば、除草剤耐性遺伝子の単離の

ための有用な遺伝子源となる。

【0016】

4. 遺伝子のクローニング法

遺伝子のクローニング法には、タンパク質の情報を利用する方法、核酸の情報を利用する方法及び遺伝学的方法がある。タンパク質の情報を利用する方法には、標的タンパク質を精製し、これに対する抗体を用いて発現型ライブラリーをスクリーニングする方法、標的タンパク質のアミノ酸配列を部分的にでも解明し、その情報から核酸プローブあるいはPCR用プライマーを合成する方法等がある。しかし、一般的に、タンパク質を精製することは、比較的困難である。一方、核酸の情報を利用する方法は、生物間における遺伝子の相同性を利用して、他の生物の遺伝子をプローブとして用い、ハイブリダイゼーション等によって、目的とする遺伝子を釣り上げるという方法である。生物間における遺伝子の相同性は、用いた生物、用いた遺伝子によって異なり、ハイブリダイゼーションの条件は、様々な条件で試みた後、経験的に求められるものであり、又、場合によっては、最適条件が求められない場合もある。又、これらの方法では、得られた遺伝子の産物の生物活性を何らかの方法で確認する必要がある。

【0017】

一方、遺伝学的方法とは、目的とする遺伝子が遺伝的に欠損した突然変異微生物株例えば大腸菌、枯草菌、酵母等に、異種生物由来の同一タンパク質遺伝子をその生物中で発現するような形で導入し、生育を相補させるという方法である。この方法は遺伝的相補法とも呼ばれ、遺伝子を単離した時点で、遺伝子の産物の生物活性は、既に、確認済みである。しかし、高等生物由来の遺伝子を、微生物で発現させた場合、翻訳後の修飾例えば糖鎖の付加等がなされずに酵素活性を発揮できない、ベクター由来のタンパク質あるいはトランジットペプチドがN端に付加されているため酵素活性を発揮できない、等が原因で、生育が相補されない可能性がある。それにもかかわらず、植物のテトラピロール合成系においてGlu-tRNAからGlutamate-1-semialdehydeを合成するGlu-tRNA Reductase、Glutamate-1-semialdehydeから5-Aminolevulinic acidを合成するGlutamate-1-semialdehyde aminotransferaseがそれぞれ、大腸菌のhemA遺伝子欠損変異株、hemL遺伝子欠

損変異株を用いて遺伝的相補法によってクローニングされている (Ilag, L. L. et al., (1994) Plant Cell 6:265-275.)。従って、本発明においては植物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼを遺伝的方法でクローニングする場合にも、大腸菌の遺伝子欠損変異株を利用することが有効であると考えられる。プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼを欠失した大腸菌の変異株としては、hemG遺伝子欠損変異株のSASX38 (Sasarman, A. et al. (1979) J.Gen.Microbiol.113:297-303.) 及びVSR751 (Nishimura, K. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:8076-8080.) が知られている。

【0018】

5. cDNAライブラリーの作製法

植物の全RNAは、RNA抽出法として知られている公知の方法、例えばグアニジン法、グアジニン・フェノール法、SDSフェノール法等を用い、植物体から抽出することができる。さらに、抽出された全RNAから常法、例えばオリゴdTセルロース法等によってmRNAを精製することができる。

cDNAの作製は、前記実験書の方法等、常法に従って行うことができる。精製されたmRNAを鋳型とし、Okayama-Berg法、Gubler-Hoffman法等によって二本鎖cDNAを合成することができる。

cDNAを、常法に従って、プラスミド、あるいはλファージ等に結合し、cDNAライブラリーを作製することができる。用いるベクターとしては、MC Sの上流にlacZ、tac等のプロモーターを持つもの（例えばpUC系プラスミド、λgt11系ファージ）を選択し、発現型cDNAライブラリーを作製することが望ましい。さらに、プライマーとしてプライマーアダプター等を用いることによって一方向性のライブラリーを作製することもできる。

【0019】

6. プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼcDNAのクローニング及び解析

発現型cDNAライブラリーを大腸菌のhemG（プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子）欠損突然変異株中に導入し、生育を相補するcDNAクローンを単離することによってプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子をクローニングすることができる。クローニングした遺伝子はマキシム・ギルバート法や

、サンガー法によって全塩基配列を解明することができる。さらに市販の塩基配列解析ソフトウェア、例えばGenetyx (SDC社)、DNASIS (日立ソフトウェアエンジニアリング社) を用いてタンパク質をコードする部分の検索、既知の遺伝子との塩基配列の相同性等の解析を行うことができる。

【0020】

7. 光要求型除草剤耐性カルスからの光要求型除草剤耐性プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子のクローニング

プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの光要求型除草剤耐性型への変換に起因する光要求型除草剤耐性機構を有するタバコカルスからプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子をクローニングする場合、必ずしもcDNAライブラリーの構築及び遺伝的相補法を行う必要はなく、PCRによって比較的容易にクローニングすることができる。本発明で明らかにされたタバコの葉緑体型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子の塩基配列情報から、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼをコードするオープンリーディングフレーム全体を増幅するPCRプライマーをデザインし、これらを用いてRT-PCR (mRNAを逆転写酵素によってcDNAに変換し、これをPCRにかける) を行えば、比較的容易に生物活性を持ったプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子のクローニング及びプラスミドベクターへのサブクローニングを行うことができる。光要求型除草剤耐性カルスから得られた各遺伝子の光要求型除草剤に対する耐性の程度は、得られたプラスミドを大腸菌のhemG欠損変異株に導入し、得られた大腸菌の生育に対する光要求型除草剤の阻害の程度を比較することによって、比較的容易に検討することができる。

【0021】

8. 光要求型除草剤耐性植物の作出

本発明で示された光要求型除草剤耐性プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子を用いれば、光要求型除草剤耐性植物を作出することができる。すなわち、植物細胞中で機能するプロモーター、光要求型除草剤耐性プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子、植物細胞中で機能するターミネーターからなる発現カセットを適当なプラスミドベクターに組み込み、公知の遺伝子導入法、例えば

、アグロバクテリウム法、プロトプラストへのエレクトロポレーション法、植物組織へのパーティクルガン法等を用い、発現カセットを植物細胞中に導入し、形質転換植物を作出することができる。得られた植物は光要求型除草剤耐性という農業上有用な形質を持つ。又、異なった遺伝子を持つ発現カセットも同時に利用すれば、本遺伝子によって発現される光要求型除草剤耐性という性質を、形質転換植物の選択マーカーとして利用することもできる。

【00022】

適当なプラスミドベクターとしてはアグロバクテリウム法を用いる場合には、pBI系プラスミドあるいはpMON系プラスミド等を挙げることができ、その他の方法を用いる場合にはpUC系プラスミド、pBluescript系プラスミド等を挙げるができる。又、植物で機能するプロモーターとしては、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35Sプロモーター等、植物で機能するターミネーターとしてはCaMVターミネーター等が挙げられる。これらに関しては、前述の実験書、例えばPlant Molecular Biology Manual, Gelvin, S. A. et al. Kluwer Academic Publishers, 1991, 1995(Second edition)等に、詳細な説明が記載されている。

【0023】

【実施例】

以下に実施例を示して本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は、これらに限定されるものではない。

実施例1. 光要求型除草剤耐性タバコカルスの選抜

A. タバコプロトプラストの調製、カルスの再生及び光要求型除草剤に対する感受性の検討

温室内で全高40cm程に生育させたタバコ (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi NC) の葉を切り取り、メスで5cm画の大きさに切った後、70%エタノールに30秒間、次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (有効塩素濃度1%) に15分間浸漬し、表面殺菌した。滅菌水で3回洗浄した後、上皮細胞を除去し、酵素液 (1% cellulase onozuka R-10及び0.05% macerozyme R-10(ヤクルト社)を含む0.6Mマンニトール(pH 5.8)) に26℃で3時間浮遊させた。酵素処理後、Murasige-Skoog (MS) 培地で3回遠心

洗浄し、得られたプロトプラストを1ppmのNAA及びBAを添加した0.6%寒天を含むMS固体培地に細胞数が 10^8 /mlとなるように包埋し、シャーレに1mmの厚さにまいた。暗黒下、27℃で培養し、プロトプラストからカルスを再生させた。培養4週間後、1mm程になるまで生育したカルスを含む寒天培地を1cm幅の短冊状に切り、様々な濃度のET-62311（化合物名：4-クロロ-3-[2,4-ジクロロ-5-(2-プロパニルオキシ)フェニル]-5-ジフルオロメトキシ-1-メチルピラゾール，英文名：4-chloro-3-[2,4-dichloro-5-(2-propenyloxy)phenyl]-5-difluoromethoxy-1-methylpyrazole）を添加したMS固体培地上にのせ、タバコカルスの光要求型除草剤に対する感受性を検討した。その結果、表1に示すように、10nMで完全に枯死することが明らかとなった。

【0024】

B. 光要求型除草剤に対して高度な耐性を示すカルスの選抜

タバコカルスが完全に枯死する濃度の2倍の濃度（20nM）のET-62311を含む培地を用い、光要求型除草剤耐性カルスの選抜を開始した。供試した 1×10^{10} のプロトプラストからの再生過程で 1×10^5 の耐性カルスが得られた（表2）。得られた耐性カルスを順次ET-62311の濃度を上げた培地に移植し、最終的に2,400nMの濃度でも生育可能な36株が得られ、特に生育が旺盛な3株（ETR-056、ETR-245及びETR-253株）を選抜した。

【0025】

実施例2. 光要求型除草剤耐性カルスにおける耐性機構の解析

A. 光要求型除草剤耐性株におけるプロトポルフィリンIXの蓄積

選抜した3株の光要求型除草剤に対する耐性機構を解析することを試みた。光要求型除草剤処理植物体中では、プロトポルフィリンIXの蓄積が報告されているため、光要求型除草剤処理した耐性カルスにおけるプロトポルフィリンIXの蓄積を経時的に、測定することを試みた。ET-62311 1,200nMを含むMS液体培地で明条件下で継代培養している耐性カルスをET-62311を含まないMS液体培地で24時間暗条件下で培養した後、ET-62311 1,200nMを含むMS液体培地に移植し、暗条件下で6、12、18、24、32及び48時間培養後にカルスを採取し、プロトポルフィリンIX量を測定した。カルスからのプロトポルフィリンIXの抽出及び定量は、以下の様に行った（Matringe, M. et al. (1989) Biochem, J. 260:231-235.）。カルス5

00mg (生重) を乳鉢で破碎し、アセトン:1N NH_4OH (9:1) 7.5mlで抽出した。抽出液を3,000xg、10分間遠心分離し、上清を採取した。得られた上清にヘキサンを2.5ml加え、十分に振とうした後、下層を回収した。さらに2回ヘキサンで洗浄した後、得られた下層中のプロトポルフィリンIXの量を、蛍光分光光度計でEx 405nm-Em 631.5nmの値から測定した。なお、抽出操作は全て安全光下で行った。

その結果、プロトポルフィリンIX量は、感受性株では24時間後で $1.3\mu\text{g/g}$ 生重、48時間後で $1.9\mu\text{g/g}$ 生重、ETR-056株では24時間後で $1.7\mu\text{g/g}$ 生重、48時間後で $4.6\mu\text{g/g}$ 生重であり、時間の経過と共にプロトポルフィリンIXの蓄積が認められた。一方、ETR-245及びETR-253株ではプロトポルフィリンIXの蓄積はほとんど認められなかった。

【0026】

B. 光要求型除草剤耐性株の各種除草剤に対する耐性

さらに、様々な作用点を有する薬剤に対する各耐性株の耐性を検討した。光要求型除草剤でプロトポルフィリンIXを蓄積させるフオメサフェン (商品名フレックス) 及びオキサジアゾン (商品名ロンスター)、クロロフィル合成阻害剤でブリーチングを引き起こすピラゾキシフェン (商品名パイサー)、アミノ酸合成阻害剤であるDPX-84、ピアラフォス (商品名バスタ)、グリホセート (商品名ラウンドアップ)、タンパク質合成阻害剤であるブタクロール (商品名マーシェット)、光合成光化学系Iの阻害剤であるプロパニル (商品名スタム)、光合成光化学系IIの阻害剤で活性酸素を生成させるパラコート (商品名プリグロックス) に対する感受性を比較した。各薬剤を含むMS液体培地に各耐性株を移植し、最小阻害濃度 (MIC) を測定した。その結果 (表3)、プロトポルフィリンノーゲンオキシダーゼ阻害剤でプロトポルフィリンIXを蓄積させるフオメサフェン、オキサジアゾンに対し、いずれの耐性株も強い抵抗性を示した。また、ETR-056株は、パラコートに対し、ETR-253株はピラゾキシフェン、DPX-84及びグリホセートに対しても抵抗性を示した。以上の結果から、ETR-056株はスーパーオキシドデイスムターゼの過剰生産等による活性酸素に対する耐性、ETR-253株は膜の透過性の低下による多剤耐性、ETR-245株は標的酵素の変異あるいは標的酵素の過剰生産による耐性と考えられた。

【0027】

C. 光要求型除草剤耐性株の他のET系除草剤に対する感受性

感受性株及びETR-056、ETR-245及びETR-253株に対するET-751（化合物名：エチル 2-クロロ-5-(4-クロロ-5-ジフルオロメトキシ-1-メチルピラゾール-3-イル)-4-フルオロフェノキシセート，英文名：ethyl 2-chloro-5-(4-chloro-5-difluoromethoxy-1-methylpyrazole-3-yl)-4-fluorophenoxyacetate）のMICを測定した。その結果、感受性株に対するMICは5nMであったが、いずれの耐性株に対するMICも2,400nM以上であり、いずれの耐性株もET-751に対して強い耐性を示すことが明らかとなった。そこで、以下の実施例では光要求型除草剤としてET-751を、耐性株としてETR-245株を用いた。

【0028】

D. 感受性及びETR-245株からのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ粗酵素液の抽出

Nicolaus, B. et al. (1993) in "Target Assays for Modern Herbicide and Related Phytotoxic Compound" Lewis Publishers, pp.35-41.に従って、MS固体培地で1カ月間培養したカルスに5倍量の抽出バッファー（50mM Tris-HCl(pH 7.5)、0.5M sucrose、0.2% BSA、1mM EDTA）を加え、ジューサーで破碎した。ガーゼで濾過した後、10,000xg、5分間、4℃で遠心分離した。得られた沈殿を再度25mlの抽出バッファーに懸濁し、150xg、2分間、4℃で遠心分離した。得られた上清を4,000xg、15分間、4℃遠心分離し、沈殿を2mlの20% グリセリンに溶解した。得られた粗酵素液のタンパク質量をタンパク質測定キット（Bio-Rad社）で測定した。

【0029】

E. プロトポルフィリノーゲンIXの調製

13gの水銀及び0.5gの薄層金属ナトリウムを500ml容の丸底フラスコに入れ、窒素ガスで5分間平衡化した後、約5分間振とうすることによって、ナトリウムアマルガムのパウダーを作製した。

8.4mgのプロトポルフィリンIXを15mlの20% エタノールを含む10mM KOHに溶解し、4℃で保存した。プロトポルフィリンIXの保存液4mlに等量の反応液（0.1M MES、50mM アスコルビン酸）を加え、調製直後の16mgのナトリウムアマルガムを

添加し、窒素ガス下、暗所で激しく振とうした。この反応液を暗所で3重のガラスフィルターで濾過し、0.1M MES (pH4.5) で2.5倍に希釈し、200 μ M プロトポルフィリノーゲンIXとして1mlずつ遮光した試験管に分注し、-80℃で保存した。

【0030】

F. プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性の測定

反応バッファー (100mM Tris-HCl(pH 7.6)、1mM EDTA、5mM DTT、0.03% Tween 80) 3mlを蛍光分光光度計のセルに分注後、粗酵素液を終濃度が0.1mg タンパク質/mlになるように添加し、室温までゆっくり加熱した。加熱後、プロトポルフィリノーゲンIXを終濃度が2 μ Mとなるように添加し、窒素ガスで気相を置換して反応を開始した。反応10分後からの30分間の蛍光を蛍光分光光度計でモニターし、酵素活性を測定した (Ex:405nm、Em:631.5nm)。

【0031】

G. ETR-245株から抽出したプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼに対するET-751の阻害活性

感受性タバコカルス及びETR-245株から抽出した粗酵素液におけるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性及び及びET-751による阻害の程度を比較した (表4)。その結果、感受性株由来の粗酵素液の活性は2.39unit、ETR-245株由来の粗酵素の活性は2.85unitであり、両者の活性に大きな違いは認められなかった。一方、感受性株由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性に対するET-751の50%阻害濃度 (IC_{50}) は48nMであるのに対し、ETR-245株由来の酵素活性に対するET-751の IC_{50} は5,000nM以上であり、酵素レベルでは100倍以上の耐性を示した。なお、5,000nM以上では反応液が白濁し、蛍光の測定が不可能であった。以上の結果から、ETR-245株における光要求型除草剤耐性の作用機作は、光要求型除草剤の標的酵素であるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの過剰生産に起因するのではなく、酵素の構造に何らかの変異が生じたことに起因すると考えられた。

【0032】

実施例3. タバコプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ cDNAのクローニング

A. mRNAの調製

タバコ (*Nicotiana tabacum* var. SR1) の緑葉を9g切り取り、液体窒素中で磨碎した。磨碎した緑葉に40mlのRNA抽出用緩衝液 (200mM Tris-HCl (pH9.0), 100mM NaCl, 10mM EDTA, 0.5% SDS, 0.1% 2-ME) 及び40mlのトリス飽和フェノールを加え、10分間激しく振とう後、2,000xg、10分間遠心分離して上清を回収した。この上清にトリス飽和フェノールを等量加え、10分間の振とう及び10分間の遠心分離を繰り返した。得られた上清に、等量のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25:24:1) を加え、10分間の振とう、5分間の遠心分離を2回行った。得られた上清に等量のクロロホルム：イソアミルアルコール (24:1) を加え10分間の振とう、3分間の遠心分離を2回行った。得られた上清に10分の1量の3M酢酸ナトリウム (pH5.2) 及び2.5倍量のエタノールを加え、-80℃に30分間静置した。静置後、2,000xg・20分間・4℃で遠心分離し、得られた沈殿を70%エタノールで洗浄した。乾燥した沈殿に蒸留水を加え1mg/mlに希釈し、終濃度が2Mとなるように10M塩化リチウムを加え、氷上で2時間静置した。静置後、2,000xg・30分間・4℃の遠心分離によって沈殿を回収し、全RNA画分を得た。

全RNA画分からのmRNAの精製はオリゴdTスパンカラム (ファルマシア社製) を用い、付属の説明書に従って行った。

【0033】

B. cDNAライブラリーの作製

cDNAライブラリーの作製はSuperscript Lambda System (GIBCO BRL社) を用いた。このキットは第1鎖合成時にプライマーアダプターを用い、得られたcDNAをλgt22AのlacZプロモーターに対して正方向にそう入することが可能である。

上記の方法で得た4μgのmRNAを鋳型とし、キット添付の説明書に従ってcDNA第1鎖合成、cDNA第2鎖合成、アダプターの結合、制限酵素処理及びカラムクロマトグラフィーを行った。得られたcDNAをλgt22Aアームと結合させた後、Gigapack[■]Gold (ストラタジーン社) を用い、添付の説明書に従ってファージ粒子を再構成させた。約190万の独立クローンを含むプライマリーライブラリーを大腸菌Y1090 (r-) 株に感染、増殖させ、増幅ライブラリーとして保存

した。

【0034】

C. 遺伝的相補法

大腸菌のhemG（プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ）遺伝子欠損変異株であるSASX38株を用い、Nishimuraらの方法（Nishimura, K. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:8076-8080.）に従って、遺伝的相補法を行った。10mM MgSO₄及び0.2% マルトースを含むLB液体培地中で前培養したSASX38株に上記の増幅cDNAライブラリーを感染させ、遺伝子発現を誘導した後、LB固体培地上にまいた。37℃で2日間培養後、多数の小さなコロニー中にいくつかの生育の回復した大きなコロニーが認められた。大きなコロニーをLB液体培地中で一晚培養後、4%になるようにクロロホルムを加え、よく攪拌し、30分間以上室温に放置後、遠心分離し、上清としてファージ粒子を得た。得られたファージ粒子を、再び大腸菌Y1090 (r-) 株に感染させ、単一プラークを4%クロロホルムを含むSM培地に懸濁した。回収した組換えファージ粒子は、SASX38株に再感染させ、生育回復能を示すものだけを再選抜した。以上のような方法によって、これら組換えファージベクターによる、大腸菌におけるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性の発現が確認された。

【0035】

D. cDNAインサートの分析

cDNAインサートの増幅はPCRによって行った。すなわち、回収した組換えファージ粒子に含まれるDNAを鋳型とし、Taq DNA polymerase (TAKARA EX Taq、宝酒造社)、λgt22A用フォワードプライマー（5'-ATT GGT GGC GAC GAC TCC TGG AG-3'、配列番号4）及びリバースプライマー（5'-CCA GAC CAA CTG GTA ATG GTA GCG-3'、配列番号5）を用いて、94℃で1.5分間、69℃で1.5分間、72℃で2分間の反応からなる1サイクルを、30サイクル行った。反応産物の一部をアガロースゲル電気泳動によって分析したところ、いずれのサンプルにも2.0kbp前後のcDNAが増幅されていることが明らかとなった。増幅されたcDNAをクロロホルム処理およびエタノール沈殿によって回収した後、制限酵素切断解析によって比較したところ、いずれのcDNAにもEcoRV部位が認められた。

【0036】

E. cDNAインサートのサブクローニング及び生物活性の確認

PCRによって増幅されたcDNAインサート中で最大のものを、pBluescript SK(-) (ストラタジーン社) のEcoRV部位に、前述の実験書 (例えば、Current Protocols in Molecular Biology, Jhon Wiley & Sons, Ausubel, M. et al.) に記載のTAクローニング法によって、lacZプロモーターに対し正方向にそう入した。すなわち、pBluescript SK(-) をEcoRV切断後回収し、Taq DNA polymerase (TAKARA EX Taq、宝酒造社) を加え、dTTPの存在下で、75℃で2時間反応させ、プラスミドの3' 端にTを付加した。Tを付加後回収したプラスミドと、PCR後回収した最大のcDNAインサートとを、DNA Ligation Kit (宝酒造社) を用いて、添付の説明書に従って、結合させた。得られた結合反応液を用いて、CaCl₂法によって作製した大腸菌XL-1 Blue株 (Stratagene社) のコンピテントセルを形質転換し、IPTG、Xgal及びアンピシリンを含むLB固体培地にまき、37℃で一晩培養した。培養後、インサートの挿入された白色のコロニーをいくつか選択し、アンピシリンを含むLB液体培地中で一晩振とう培養した後、アルカリライシス法によってプラスミドDNAを調製した。得られたプラスミドDNAを制限酵素切断し、cDNAが正方向に挿入されたプラスミドを持つ宿主大腸菌を選抜した。得られたプラスミドをpBntPX-1 (図1) と名付け、選抜した宿主大腸菌は15%になるようにグリセリンを加え、-80℃で保存した。

pBntPX-1を持つ大腸菌をアンピシリンを含むLB液体培地中で一晩培養後、塩化セシウム法によって、プラスミドを大量に精製した。得られたプラスミドを用いて、CaCl₂法によって作製した大腸菌SASX38株のコンピテントセルを形質転換した。形質転換したSASX38株をLB培地にまき、28℃で一晩培養した。その結果、pBntPX-1を用いた場合には、小さなコロニー中に多数の生育の回復した大きなコロニーが認められた。以上のように、pBntPX-1による、大腸菌におけるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性の発現が確認された。

【0037】

F. DNA塩基配列の解明

上述の大腸菌SASX38株の生育を回復させたpBntPX-1から、Kilo-Sequence用Del

etion kit (宝酒造社) を用いて添付の説明書に従ってディリシヨクロンを作製し、Cycle Sequencing kit AmpliTaq FS (パーキンエルマー社) 及びオートシーケンサー (ABI PRISM 310、パーキンエルマー社) を用いて添付の説明書に従って塩基配列を解明した。得られた全塩基配列及びオープンリーディングフレームにおけるアミノ酸配列を、配列表の配列番号 1 に示した。遺伝子解析ソフト Genetyx (SDC社) を用いて、塩基配列及びアミノ酸配列を、既知の (WO 95/34659) シロイヌナズナのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼのそれらと比較し、相同性を検討した。その結果、pBNtPX-1 はシロイヌナズナの葉緑体型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子と核酸レベルで 69%、アミノ酸レベルで 76% (表 5) の高い相同性を示し、タバコの葉緑体型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子であると考えられた。

また、本ポリペプチドは多くの生物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの N 端に保存されているジヌクレオチドバインディングドメイン (GXGXXG) (Nishimura, K. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:8076-8080.) を有していることからプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼであることが確認された。また、枯草菌及び動物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼでは、このドメインの上流に 8~11 アミノ酸しか認められないのに対して、タバコの葉緑体型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼでは 77 アミノ酸が認められ、タバコにおいては、この部分が葉緑体用のトランジットペプチドであると考えられた。

【0038】

実施例 5. 光要求型除草剤耐性タバコカルのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子

A. PCR によるクローニング

光要求型除草剤耐性カルス ETR-245 株及び感受性カルスからそれぞれ SDS / フェノール法によって全 RNA を抽出後、mRNA purification kit (ファルマシア社) によって mRNA を精製した。精製した mRNA の 1 μ g を鋳型とし、Oligo(dT)12-18 (ライフテックオリエンタル社) をプライマーとし、SuperscriptTM ■ RNaseH - Reverse Transcriptase (ライフテックオリエンタル社) によって添付の説明書に従って、37℃、1 時間の逆転写反応を行った後、フェノール/クロロホルム

抽出及びエタノール沈殿によってcDNAを精製した。

得られたcDNAを鋳型とし、PCRによってプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子を増幅することを試みた。PCR用のプライマーとしては、フォワードプライマー (5'-GCG GTC TAC AAG TCA GGC AGT CAT-3'、配列番号6) 及びリバースプライマー (5'-CAT GCC AAT TTT CCC AAG GCA TGA TCG TAT T-3'、配列番号7) を用い、Taq DNA polymerase (TAKARA EX Taq、宝酒造社) によって、thin wall tube中で94℃、3分間を1サイクル、94℃、20秒間及び61℃、30秒間、72℃、1分30秒間を30サイクル、72℃5分間を1サイクル行った。得られたPCR反応産物の一部をアガロースゲル電気泳動によって分析したところ、いずれにも1.7kbp前後のDNA断片が認められ、これらがプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子断片であると考えられた。そこで、これらDNAをOriginal TA Cloning KIT (Invitrogene社) によって、添付の説明書に従って、Tオーバーハングを持ったプラスミドベクターpCRTM2.1とライゲーションした。ライゲーション産物を用いて、CaCl₂法によって作製した大腸菌XL-1 Blue株 (Stratagene社) のコンペテントセルを形質転換し、IPTG、Xgal及びアンピシリンを含むLB固体培地にまき、37℃で一晩培養した。培養後、インサートの挿入された白色のコロニーをいくつか選択し、アンピシリンを含むLB液体培地中で一晩振とう培養した後、アルカリライシス法によってプラスミドDNAを調製した。得られたプラスミドDNAを制限酵素切断し、各cDNAが正方向に挿入されたプラスミドを持つ宿主大腸菌を選抜した。感受性株あるいはETR-245株由来の葉緑体型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子が挿入されたプラスミドを各々pCR-HCあるいはpCR-RC (図2) と名付け、プラスミドを持つ宿主大腸菌は、15%になるようにグリセリンを加え、-80℃で保存した。

これら2種のプラスミドを持つ大腸菌をアンピシリンを含むLB液体培地中で一晩培養後、塩化セシウム法によって、プラスミドを大量に精製した。得られたプラスミドを用いて、CaCl₂法によって作製した大腸菌SASX38株のコンペテントセルを形質転換した。形質転換したSASX38株をLB培地にまき、28℃で一晩培養した。その結果、いずれのプラスミドを用いた場合にも、小さなコロニー中に多数の生育の回復した大きなコロニーが認められた。以上のように、pCR-HC及びpC

R-RCによる、大腸菌におけるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性の発現が確認された。

【0039】

B. 各遺伝子産物のET-751耐性度の比較

上述の2種のプラスミドを含む大腸菌SASX38株を、 $50\mu\text{g/ml}$ のアンピシリンを含むLB液体培地で 28°C で終夜振とう培養した。 OD_{600} を測定した後、 $50\mu\text{g/ml}$ のアンピシリン及び0、1、10、100、1,000、2,000、5,000あるいは10,000nMのET-751を含むLB液体培地に、同一の OD_{600} 値となるように加え、 28°C で振とう培養した。経時的に一部を採取し、マイクロプレートリーダー（MTP-120、コロナ電気（株））で OD_{530} を測定し、対照区（ET-751 0nM）の大腸菌の生育を50%になるように阻害する濃度（ IC_{50} ）を算出した。その結果、pCR-HCあるいはpCR-RCを含む大腸菌では、それぞれ IC_{50} は約2.5nMあるいは10,000nM以上となり、R/S比（耐性型の IC_{50} ／感受性型の IC_{50} ）は、4,000以上となった。なお、10,000nM以上では培地が白濁し、 OD_{530} の測定が不可能であった。以上の結果から、ETR-245株におけるET-751耐性機構は、葉緑体型のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子に何らかの変異が生じることによって該酵素が光要求型除草剤耐性型に変異したことであると考えられた。

【0040】

C. 感受性株及びETR-245株由来の葉緑体型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子の塩基配列の比較

pCR-HCあるいはpCR-RCに含まれる感受性株あるいはETR-245株由来の葉緑体型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子の全塩基配列それぞれ、比較することを試みた。タバコ葉由来の遺伝子の塩基配列情報から、プライマーウォーキング用のプライマーを合成し、両遺伝子の全塩基配列を解明した。その結果、pCR-HCの塩基配列はタバコ葉由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子と全く同一の配列であったが、pCR-RCでは1カ所にのみ変異が認められた。すなわち、配列番号1の717番目の塩基がCからTへと変異し、その結果、配列番号1の231番目のアミノ酸が、アラニンからバリンへと変異していた。pCR-RCにコードされる光要求型除草剤耐性プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼのアミノ

酸配列を配列表の配列番号2に、遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号3に示した。タバコとシロイヌナズナのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼのアミノ酸配列の相同性は高く（表5）、この変異はWO 95/34659に記載されたシロイヌナズナのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼにおける220番目のアミノ酸であるアラニンのバリンへの変異に伴う光要求型除草剤耐性型への変異（pAraC-1Val）とほぼ同等のものであった。

【0041】

比較例1. シロイヌナズナの光要求型除草剤耐性型遺伝子

A. シロイヌナズナの葉緑体型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子のクローニング及び光要求型除草剤耐性型への変換

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* var. Columbia) の葉緑体型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子のクローニングはタバコの場合と同様に、cDNAライブラリーの作製、大腸菌のhemG欠損変異株SASX38を用いた遺伝的相補法によって行った。得られた遺伝子はpBluescript[■]SK(-)のEcoRV部位にTAクローニング法によってサブクローニングした。プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子が正方向に挿入され、生物活性を示すプラスミドをpBatPX-C（図3）と名付けた。このプラスミドの全塩基配列も既知の塩基配列（WO 95/34659）からデザインしたプライマーを用い、プライマーウォーキングによって既知の配列と同一であることを確認した。

このプラスミドを用い、WO 95/34659に記載された、上述の220番目のアミノ酸であるアラニンのバリンへの変異による光要求型除草剤耐性プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子（pAraC-1Val）を作出することを試みた。pBatPX-Cを含む大腸菌XL-1 BlueからヘルパーファージVCS-M13（Stratagene社）を用いて1本鎖DNAを調製した後、kunkel法を利用した部位特異的突然変異用キット（Mutan-K、宝酒造社）を用い、変異導入用オリゴヌクレオチド5'-GGT GTT TAT GTT GGT GAT CC-3'（配列番号8）によって、光要求型除草剤耐性型に変換した。部位特異的突然変異操作中における非特異的な変異の可能性を排除するために、得られたプラスミド中のcDNAを再度pBluescript[■]SK(-)にサブクローニングし、さらに、cDNAの全塩基配列を解明し、目的とする塩基配列であることを

確認した。得られた光要求型除草剤耐性型プラスミドをpBA_tPX-RC (図3) と名付けた。

【0042】

B. シロイヌナズナの野性型及び光要求型除草剤耐性プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼのET-751耐性度の比較

pBA_tPX-C中のシロイヌナズナの野性型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子の産物と、pBA_tPX-RC中の光要求型除草剤耐性型遺伝子の産物との、ET-751耐性度を比較することを試みた。実施例5Bの各遺伝子産物のET-751耐性度の比較に記載された方法を用い、それぞれプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼのET-751に対するIC₅₀を測定した。その結果、野性型ではIC₅₀は約5nMであったが、光要求型除草剤耐性型では1,500nMとなり、R/S比(耐性型のIC₅₀/感受性型のIC₅₀)は約300であった。タバコの場合のR/S比は4,000以上であったため、シロイヌナズナと比較してタバコの方がR/S比が10倍以上高いことがわかった。この違いは、この両者のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼのアミノ酸配列の高い相同性を考えた場合、予期せぬ結果であった。

【0043】

【表1】

表1 ET-62311に対するタバコカルスの感受性

濃度(nM)	生存率(%)
0	100
2.5	30
5	10
10	0
20	0
40	0
80	0

【0044】

【表2】

表2 光要求型除草剤耐性株の選抜過程

濃度(nM)	耐性株数
20	100,000
30	50,000
50	40,000
75	7,200
150	254
300	120
600	66
1,200	46
2,400	36
5,000	0

供試プロトプラスト数： 1×10^{10}

【0045】

【表3】

表3 各種除草剤に対する光要求型除草剤耐性株の感受性

薬剤	MIC (ppm)			
	感受性株	ETR-056株	ETR-245株	ETR-253株
フォメサフェン	0.4	4	4	4
オキサジアゾン	1	1000	1000	1000
ブタクロール	100	100	100	100
ピラゾキシフェン	100	100	100	200
プロパニル	100	100	100	100
ビアラフォス	10	1	1	10
DPX-84	0.01	0.01	0.01	0.1
グリホセート	230	230	230	1000
パラコート	10	100	10	10

【0046】

【表4】

表4 感受性株及びETR-245株のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性に及ぼすET-751の影響

ET-751濃度 (nM)	酵素活性 (unit)	
	感受性株	ETR-245株
0	2.39	2.85
10	4.32	3.59
20	3.62	-
40	1.84	4.41
100	0.00	2.21
500	0.00	3.49
1,000	0.00	2.85
2,400	0.00	2.48
5,000	0.00	1.56
IC50値(nM)	48	>5000

1unit=1nMプロトポルフィリノーゲンIX/min/mg タンパク質

【0047】

【表5】

【0048】

【発明の効果】

本発明者は、前記課題を解決すべく、高等植物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼについて鋭意研究を行った結果、タバコ由来の、光要求型除草剤に耐性を示すプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの遺伝子のクローニング及び発現に成功した。本遺伝子産物の光要求型除草剤に対する耐性度を、既に報告され

ているシロイヌナズナ由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの耐性度と比較したところ、両者の構造の高い類似性にもかかわらず、本遺伝子産物の耐性度が大いに勝っていることが明らかとなった。

植物由来の新規且つ光要求型除草剤に高度に耐性なプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼを得た結果、該酵素を宿主植物中で発現させることによって、光要求型除草剤に高度に耐性な植物を作出することが可能である。

【0049】

【配列表1】

【0050】

【配列表2】

【0051】

【配列表3】

【0052】

【配列表4】

配列番号：4

配列の長さ：23

配列の形：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

ATTGGTGGCG ACGACTCCTG GAG

【0053】

【配列表5】

配列番号：5

配列の長さ：24

配列の形：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

CCAGACCAAC TGGTAATGGT AGCG

【0054】

【配列表6】

配列番号：6

配列の長さ：24

配列の形：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

GCGGTCTACA AGTCAGGCAG TCAT

【0055】

【配列表 7】

配列番号 : 7

配列の長さ : 31

配列の形 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

CATGCCAATT TTCCAAGGC ATGATCGTAC T

【0056】

【配列表 8】

配列番号 : 8

配列の長さ : 20

配列の形 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

GGTGTATG TTGGTGATCC

【図面の簡単な説明】

【図 1】 pBNtPX-1の模式図

【図 2】 pCR-HC及びpCR-RCの模式図

▼ : pCR-RCにおける変異

(配列番号 1 の717番目の塩基がCからTに変異し、

231番目のアミノ酸がアラニンからバリンに変異)

【図 3】 pBAtpX-c及びpBAtpX-RCの模式図

▼ : pBAtpX-RCにおける変異

(WO 95/34659のpAraC-1Valと同一の変異)

【表5】

タバコ（上段）及びシロイヌナズナ（下段）の葉緑体型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼのアミノ酸配列の比較

相同性：75.9%

```

1'  MTTTPIANHPNIFTHQSSSSPLAFLNRTSFIPFSSISKRN-SVN-CNGWRTRCSVAKDYT
      *..*..*   ..*.*.* *..*   * ***** . *
1"  MELSLLRPTTQSLLPFSKPNLRLNVYKPLRLRCSVAGGPT

59'  VPSSAVDGGPAAEL--DCVIVGAGISGLCIAQVMSANY---PNLMVTEARDRAGGNITT
      * ** ..** ....  *****.*****.....   ***.***.*.*.***.*
42"  VGSSKIEGGGGTTITDCVIVGGGISGLCIAQALATKHPDAAPNLIVTEAKDRVGGNIIT

113'  VERDGYLWEEGPNSFQPSDPMLTMAVDCGLKDDLVLGDPNAPRFVLWKGKLRPVPSKLT
      * .*.*****.*****.***.*****.*****.*****.*****
102"  REENGFLWEEGPNSFQPSDPMLTMVVDSGLKDDLVLGDPTAPRFVLWNGKLRPVPSKLT

173'  LPFFDLMSIPGKLRAGFGAIGLRPSPPGHEESVEQFVRRNLGGEVFERLIEPFCSGVYAG
      ***** **.******.*.*****.*****.*****.*****
162"  LPFFDLMSIGGKIRAGFGALGIRPSPPGREESVEEFVRRNLGDEVFERLIEPFCSGVYAG

233'  DPSKLSMKAAFGKWKLEETGGSIIIGGTFKAIKERSSTPKAPRDPRLPKPKGQTVGSFRK
      *****.....*****.***...*** *****.*****
222"  DPSKLSMKAAFGKWKLEQNGGSIIGGTFKAIQERKNAPKAERDPRLPKPKQGQTVGSFRK
    
```

【表5】

293' GLRMLPDAISARLGSKLKLSSITKSEKGGYHLTYETPEGVVSLQSRISIVMTVPSYV
 *****.*****.*****.*** *.***.*****. *.**.*.*****.*
 282" GLRMLPEAISARLGSKVKLSWKLSGITKLESGGYNLTYETPDGLVSVQSKSVVMTVPSHV
 353' ASNILRPLSVAAADALS NFYPPVGAVTISYPQEAIRDERLVDGELKGFGQLHPRTQGVE
 ..***. **.***..*****. **.****.****.* *.*****
 342" ASGLLRPLSESAANALSKLYPPVAAVSISYPKEAIRTECLIDGELKGFGQLHPRTQGVE
 413' TLGTIYSSSLFPNRPKGRVLLN YIGGAKNPEILSKTESQLVEVVDRLRKMLIKPKAQ
 ***** **..*****..*..****.*..***.*****..
 402" TLGTIYSSSLFPNRAPPGRILLN YIGGSTNTGILSKSEGELVEAVDRDLRKMLIKPNST
 473' DPLVVGVRVWPQAIPQFLVGHLDLSTAKAAMNDNGLEGLFLGGNYVSGVALGRCVEGAY
 .**.*.*.***.....* *****.*****
 462" DPLKLGVRVWPQAIPQFLVGHFDILDTAKSSLTSSGYEGLFLGGNYVAGVALGRCVEGAY
 533' EVASEVTGFLSRYAYK 548
 *. * **..*.*****
 522" ETAIEVNNFMSRYAYK 537

【配列表1】

配列番号：1

配列の長さ：1874

配列の形：核酸

トポロジー：直鎖状

鎖の数：二本鎖

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：タバコ (Nicotiana tabacum)

株名：Xanthi NC

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：26..1672

特徴を決定した方法：P

AGCGCGGTCT ACAAGTCAGG CAGTC ATG ACA ACA ACT CCC ATC GCC AAT CAT	52
Met Thr Thr Thr Pro Ile Ala Asn His	
1 5	
 CCT AAT ATT TTC ACT CAC CAG TCG TCG TCA TCG CCA TTG GCA TTC TTA	100
Pro Asn Ile Phe Thr His Gln Ser Ser Ser Ser Pro Leu Ala Phe Leu	
10 15 20 25	
 AAC CGT ACG AGT TTC ATC CCT TTC TCT TCA ATC TCC AAG CGC AAT AGT	148

Asn	Arg	Thr	Ser	Phe	Ile	Pro	Phe	Ser	Ser	Ile	Ser	Lys	Arg	Asn	Ser		
				30				35						40			
GTC	AAT	TGC	AAT	GGC	TGG	AGA	ACA	CGA	TGC	TCC	GTT	GCC	AAA	GAT	TAC		196
Val	Asn	Cys	Asn	Gly	Trp	Arg	Thr	Arg	Cys	Ser	Val	Ala	Lys	Asp	Tyr		
			45					50					55				
ACA	GTT	CCT	TCC	TCA	GCG	GTC	GAC	GGC	GGA	CCC	GCC	GCG	GAG	CTG	GAC		244
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ala	Val	Asp	Gly	Gly	Pro	Ala	Ala	Glu	Leu	Asp		
			60					65					70				
TGT	GTT	ATA	GTT	GGA	GCA	GGA	ATT	AGT	GGC	CTC	TGC	ATT	GCG	CAG	GTG		292
Cys	Val	Ile	Val	Gly	Ala	Gly	Ile	Ser	Gly	Leu	Cys	Ile	Ala	Gln	Val		
	75						80						85				
ATG	TCC	GCT	AAT	TAC	CCC	AAT	TTG	ATG	GTA	ACC	GAG	GCG	AGA	GAT	CGT		340
Met	Ser	Ala	Asn	Tyr	Pro	Asn	Leu	Met	Val	Thr	Glu	Ala	Arg	Asp	Arg		
	90					95				100					105		
GCC	GGT	GGC	AAC	ATA	ACG	ACT	GTG	GAA	AGA	GAC	GGC	TAT	TTG	TGG	GAA		388
Ala	Gly	Gly	Asn	Ile	Thr	Thr	Val	Glu	Arg	Asp	Gly	Tyr	Leu	Trp	Glu		
			110						115				120				
GAA	GGT	CCC	AAC	AGT	TTC	CAG	CCG	TCC	GAT	CCT	ATG	TTG	ACT	ATG	GCA		436
Glu	Gly	Pro	Asn	Ser	Phe	Gln	Pro	Ser	Asp	Pro	Met	Leu	Thr	Met	Ala		
			125					130					135				
GTA	GAT	TGT	GGA	TTG	AAG	GAT	GAT	TTG	GTG	TTG	GGA	GAT	CCT	AAT	GCG		484
Val	Asp	Cys	Gly	Leu	Lys	Asp	Asp	Leu	Val	Leu	Gly	Asp	Pro	Asn	Ala		

140	145	150	
CCC CGT TTC GTT TTG TGG AAG GGT AAA TTA AGG CCC GTC CCC TCA AAA			532
Pro Arg Phe Val Leu Trp Lys Gly Lys Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys			
155	160	165	
CTC ACT GAT CTT CCC TTT TTT GAT TTG ATG AGC ATT CCT GGC AAG TTG			580
Leu Thr Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Pro Gly Lys Leu			
170	175	180	185
AGA GCT GGT TTT GGT GCC ATT GGC CTC CGC CCT TCA CCT CCA GGT CAT			628
Arg Ala Gly Phe Gly Ala Ile Gly Leu Arg Pro Ser Pro Pro Gly His			
190	195	200	
GAG GAA TCA GTT GAG CAG TTC GTG CGT CGT AAT CTT GGT GGC GAA GTC			676
Glu Glu Ser Val Glu Gln Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Gly Glu Val			
205	210	215	
TTT GAA CGC TTG ATA GAA CCA TTT TGT TCT GGT GTT TAT GCT GGT GAT			724
Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp			
220	225	230	
CCC TCA AAA CTG AGT ATG AAA GCA GCA TTT GGG AAA GTT TGG AAG TTG			772
Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Lys Leu			
235	240	245	
GAA GAA ACT GGT GGT AGC ATT ATT GGA GGA ACC TTT AAA GCA ATA AAG			820
Glu Glu Thr Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe Lys Ala Ile Lys			
250	255	260	265

GAG AGA TCC AGT ACA CCT AAA GCG CCC CGC GAT CCG CGT TTA CCT AAA 868
 Glu Arg Ser Ser Thr Pro Lys Ala Pro Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys
 270 275 280

CCA AAA GGA CAG ACA GTT GGA TCA TTC AGG AAG GGT CTC AGA ATG CTG 916
 Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly Leu Arg Met Leu
 285 290 295

CCG GAT GCA ATC AGT GCA AGA TTG GGA AGC AAA TTA AAA CTA TCA TGG 964
 Pro Asp Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Ser Lys Leu Lys Leu Ser Trp
 300 305 310

AAG CTT TCT AGC ATT ACT AAG TCA GAA AAA GGA GGA TAT CAC TTG ACA 1012
 Lys Leu Ser Ser Ile Thr Lys Ser Glu Lys Gly Gly Tyr His Leu Thr
 315 320 325

TAC GAG ACA CCA GAA GGA GTA GTT TCT CTT CAA AGT CGA AGC ATT GTC 1060
 Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Val Val Ser Leu Gln Ser Arg Ser Ile Val
 330 335 340 345

ATG ACT GTG CCA TCC TAT GTA GCA AGC AAC ATA TTA CGT CCT CTT TCG 1108
 Met Thr Val Pro Ser Tyr Val Ala Ser Asn Ile Leu Arg Pro Leu Ser
 350 355 360

GTT GCC GCA GCA GAT GCA CTT TCA AAT TTC TAC TAT CCC CCA GTT GGA 1156
 Val Ala Ala Ala Asp Ala Leu Ser Asn Phe Tyr Tyr Pro Pro Val Gly
 365 370 375

GCA GTC ACA ATT TCA TAT CCT CAA GAA GCT ATT CGT GAT GAG CGT CTG 1204
 Ala Val Thr Ile Ser Tyr Pro Gln Glu Ala Ile Arg Asp Glu Arg Leu
 380 385 390

GTT GAT GGT GAA CTA AAG GGA TTT GGG CAG TTG CAT CCA CGT ACA CAG 1252
 Val Asp Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Thr Gln
 395 400 405

GGA GTG GAA ACA CTA GGA ACG ATA TAT AGT TCA TCA CTC TTC CCT AAC 1300
 Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn
 410 415 420 425

CGT GCC CCA AAA GGT CGG GTG CTA CTC TTG AAC TAC ATT GGA GGA GCA 1348
 Arg Ala Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ala
 430 435 440

AAA AAT CCT GAA ATT TTG TCT AAG ACG GAG AGC CAA CTT GTG GAA GTA 1396
 Lys Asn Pro Glu Ile Leu Ser Lys Thr Glu Ser Gln Leu Val Glu Val
 445 450 455

GTT GAT CGT GAC CTC AGA AAA ATG CTT ATA AAA CCC AAA GCT CAA GAT 1444
 Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Lys Pro Lys Ala Gln Asp
 460 465 470

CCT CTT GTT GTG GGT GTG CGA GTA TGG CCA CAA GCT ATC CCA CAG TTT 1492
 Pro Leu Val Val Gly Val Arg Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe
 475 480 485

TTG GTT GGT CAT CTG GAT ACG CTA AGT ACT GCA AAA GCT GCT ATG AAT 1540

Leu Val Gly His Leu Asp Thr Leu Ser Thr Ala Lys Ala Ala Met Asn
490 495 500 505

GAT AAT GGG CTT GAA GGG CTG TTT CTT GGG GGT AAT TAT GTG TCA GGT 1588
Asp Asn Gly Leu Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ser Gly
510 515 520

GTA GCA TTG GGG AGG TGT GTT GAA GGT GCT TAT GAA GTT GCA TCC GAG 1636
Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Val Ala Ser Glu
525 530 535

GTA ACA GGA TTT CTG TCT CGG TAT GCA TAC AAA TGAAACCTGT GTTGGGGGTA 1689
Val Thr Gly Phe Leu Ser Arg Tyr Ala Tyr Lys
540 545

GTCCAAACCT TGTTAGTAGT ACGATCATGC CTTGGGAAAA TTGGCATGTG CCTAAAAGTT 1749
TTGCTCATTA GAGTTATTTT AGCCTTGGA AATGATTTGT ACTTGATATC AGTCGTTTTT 1809
TTTGAGATAA AATGTTCTTG TTCAGGAAAT ATAATGTATA TCAATTTTAA ACAAAAAAAAA 1869
AAAAA 1874

【配列表2】

配列番号 : 2

配列の長さ : 548

配列の形 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 蛋白質

起源 :

生物名 : タバコ (*Nicotiana tabacum*)

株名 : SR1

Met Thr Thr Thr Pro Ile Ala Asn His Pro Asn Ile Phe Thr His Gln
1 5 10 15

Ser Ser Ser Ser Pro Leu Ala Phe Leu Asn Arg Thr Ser Phe Ile Pro
20 25 30

Phe Ser Ser Ile Ser Lys Arg Asn Ser Val Asn Cys Asn Gly Trp Arg
35 40 45

Thr Arg Cys Ser Val Ala Lys Asp Tyr Thr Val Pro Ser Ser Ala Val
50 55 60

Asp Gly Gly Pro Ala Ala Glu Leu Asp Cys Val Ile Val Gly Ala Gly
65 70 75 80

Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala Gln Val Met Ser Ala Asn Tyr Pro Asn
85 90 95

Leu Met Val Thr Glu Ala Arg Asp Arg Ala Gly Gly Asn Ile Thr Thr
100 105 110

Val Glu Arg Asp Gly Tyr Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln
115 120 125

Pro Ser Asp Pro Met Leu Thr Met Ala Val Asp Cys Gly Leu Lys Asp
130 135 140

Asp Leu Val Leu Gly Asp Pro Asn Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Lys
145 150 155 160

Gly Lys Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys Leu Thr Asp Leu Pro Phe Phe
165 170 175

Asp Leu Met Ser Ile Pro Gly Lys Leu Arg Ala Gly Phe Gly Ala Ile
180 185 190

Gly Leu Arg Pro Ser Pro Pro Gly His Glu Glu Ser Val Glu Gln Phe
195 200 205

Val Arg Arg Asn Leu Gly Gly Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro
210 215 220

Phe Cys Ser Gly Val Tyr Val Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys
225 230 235 240

Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Lys Leu Glu Glu Thr Gly Gly Ser Ile
245 250 255

Ile Gly Gly Thr Phe Lys Ala Ile Lys Glu Arg Ser Ser Thr Pro Lys
260 265 270

Ala Pro Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly
275 280 285

Ser Phe Arg Lys Gly Leu Arg Met Leu Pro Asp Ala Ile Ser Ala Arg
290 295 300

Leu Gly Ser Lys Leu Lys Leu Ser Trp Lys Leu Ser Ser Ile Thr Lys
305 310 315 320

Ser Glu Lys Gly Gly Tyr His Leu Thr Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Val
325 330 335

Val Ser Leu Gln Ser Arg Ser Ile Val Met Thr Val Pro Ser Tyr Val
340 345 350

Ala Ser Asn Ile Leu Arg Pro Leu Ser Val Ala Ala Ala Asp Ala Leu
355 360 365

Ser Asn Phe Tyr Tyr Pro Pro Val Gly Ala Val Thr Ile Ser Tyr Pro
370 375 380

Gln Glu Ala Ile Arg Asp Glu Arg Leu Val Asp Gly Glu Leu Lys Gly

385	390	395	400
Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Thr Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr			
	405	410	415
Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Lys Gly Arg Val			
	420	425	430
Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ala Lys Asn Pro Glu Ile Leu Ser			
	435	440	445
Lys Thr Glu Ser Gln Leu Val Glu Val Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys			
	450	455	460
Met Leu Ile Lys Pro Lys Ala Gln Asp Pro Leu Val Val Gly Val Arg			
	465	470	475
Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val Gly His Leu Asp Thr			
	485	490	495
Leu Ser Thr Ala Lys Ala Ala Met Asn Asp Asn Gly Leu Glu Gly Leu			
	500	505	510
Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ser Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Val			
	515	520	525
Glu Gly Ala Tyr Glu Val Ala Ser Glu Val Thr Gly Phe Leu Ser Arg			
	530	535	540

特平 9-265084

Tyr Ala Tyr Lys

545

【配列表3】

配列番号：3

配列の長さ：1874

配列の形：核酸

トポロジー：核酸

鎖の数：二本鎖

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：タバコ (*Nicotiana tabacum*)

株名：SR1

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：26..1672

特徴を決定した方法：P

AGCGCGGTCT ACAAGTCAGG CAGTC ATG ACA ACA ACT CCC ATC GCC AAT CAT 52

Met Thr Thr Thr Pro Ile Ala Asn His

1

5

CCT AAT ATT TTC ACT CAC CAG TCG TCG TCA TCG CCA TTG GCA TTC TTA 100

Pro Asn Ile Phe Thr His Gln Ser Ser Ser Ser Pro Leu Ala Phe Leu

10

15

20

25

AAC CGT ACG AGT TTC ATC CCT TTC TCT TCA ATC TCC AAG CGC AAT AGT 148

Asn Arg Thr Ser Phe Ile Pro Phe Ser Ser Ile Ser Lys Arg Asn Ser	
30 35 40	
GTC AAT TGC AAT GGC TGG AGA ACA CGA TGC TCC GTT GCC AAA GAT TAC	196
Val Asn Cys Asn Gly Trp Arg Thr Arg Cys Ser Val Ala Lys Asp Tyr	
45 50 55	
ACA GTT CCT TCC TCA GCG GTC GAC GGC GGA CCC GCC GCG GAG CTG GAC	244
Thr Val Pro Ser Ser Ala Val Asp Gly Gly Pro Ala Ala Glu Leu Asp	
60 65 70	
TGT GTT ATA GTT GGA GCA GGA ATT AGT GGC CTC TGC ATT GCG CAG GTG	292
Cys Val Ile Val Gly Ala Gly Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala Gln Val	
75 80 85	
ATG TCC GCT AAT TAC CCC AAT TTG ATG GTA ACC GAG GCG AGA GAT CGT	340
Met Ser Ala Asn Tyr Pro Asn Leu Met Val Thr Glu Ala Arg Asp Arg	
90 95 100 105	
GCC GGT GGC AAC ATA ACG ACT GTG GAA AGA GAC GGC TAT TTG TGG GAA	388
Ala Gly Gly Asn Ile Thr Thr Val Glu Arg Asp Gly Tyr Leu Trp Glu	
110 115 120	
GAA GGT CCC AAC AGT TTC CAG CCG TCC GAT CCT ATG TTG ACT ATG GCA	436
Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Met Leu Thr Met Ala	
125 130 135	
GTA GAT TGT GGA TTG AAG GAT GAT TTG GTG TTG GGA GAT CCT AAT GCG	484
Val Asp Cys Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val Leu Gly Asp Pro Asn Ala	

140	145	150	
CCC CGT TTC GTT TTG TGG AAG GGT AAA TTA AGG CCC GTC CCC TCA AAA			532
Pro Arg Phe Val Leu Trp Lys Gly Lys Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys			
155	160	165	
CTC ACT GAT CTT CCC TTT TTT GAT TTG ATG AGC ATT CCT GGC AAG TTG			580
Leu Thr Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Pro Gly Lys Leu			
170	175	180	185
AGA GCT GGT TTT GGT GCC ATT GGC CTC CGC CCT TCA CCT CCA GGT CAT			628
Arg Ala Gly Phe Gly Ala Ile Gly Leu Arg Pro Ser Pro Pro Gly His			
190	195	200	
GAG GAA TCA GTT GAG CAG TTC GTG CGT CGT AAT CTT GGT GGC GAA GTC			676
Glu Glu Ser Val Glu Gln Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Gly Glu Val			
205	210	215	
TTT GAA CGC TTG ATA GAA CCA TTT TGT TCT GGT GTT TAT GTT GGT GAT			724
Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Val Gly Asp			
220	225	230	
CCC TCA AAA CTG AGT ATG AAA GCA GCA TTT GGG AAA GTT TGG AAG TTG			772
Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Lys Leu			
235	240	245	
GAA GAA ACT GGT GGT AGC ATT ATT GGA GGA ACC TTT AAA GCA ATA AAG			820
Glu Glu Thr Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe Lys Ala Ile Lys			

250	255	260	265	
GAG AGA TCC AGT ACA CCT AAA GCG CCC CGC GAT CCG CGT TTA CCT AAA				868
Glu Arg Ser Ser Thr Pro Lys Ala Pro Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys				
	270	275	280	
CCA AAA GGA CAG ACA GTT GGA TCA TTC AGG AAG GGT CTC AGA ATG CTG				916
Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly Leu Arg Met Leu				
	285	290	295	
CCG GAT GCA ATC AGT GCA AGA TTG GGA AGC AAA TTA AAA CTA TCA TGG				964
Pro Asp Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Ser Lys Leu Lys Leu Ser Trp				
	300	305	310	
AAG CTT TCT AGC ATT ACT AAG TCA GAA AAA GGA GGA TAT CAC TTG ACA				1012
Lys Leu Ser Ser Ile Thr Lys Ser Glu Lys Gly Gly Tyr His Leu Thr				
	315	320	325	
TAC GAG ACA CCA GAA GGA GTA GTT TCT CTT CAA AGT CGA AGC ATT GTC				1060
Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Val Val Ser Leu Gln Ser Arg Ser Ile Val				
	330	335	340	345
ATG ACT GTG CCA TCC TAT GTA GCA AGC AAC ATA TTA CGT CCT CTT TCG				1108
Met Thr Val Pro Ser Tyr Val Ala Ser Asn Ile Leu Arg Pro Leu Ser				
	350	355	360	
GTT GCC GCA GCA GAT GCA CTT TCA AAT TTC TAC TAT CCC CCA GTT GGA				1156
Val Ala Ala Ala Asp Ala Leu Ser Asn Phe Tyr Tyr Pro Pro Val Gly				
	365	370	375	

GCA GTC ACA ATT TCA TAT CCT CAA GAA GCT ATT CGT GAT GAG CGT CTG	1204
Ala Val Thr Ile Ser Tyr Pro Gln Glu Ala Ile Arg Asp Glu Arg Leu	
380 385 390	
GTT GAT GGT GAA CTA AAG GGA TTT GGG CAG TTG CAT CCA CGT ACA CAG	1252
Val Asp Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Thr Gln	
395 400 405	
GGA GTG GAA ACA CTA GGA ACG ATA TAT AGT TCA TCA CTC TTC CCT AAC	1300
Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn	
410 415 420 425	
CGT GCC CCA AAA GGT CGG GTG CTA CTC TTG AAC TAC ATT GGA GGA GCA	1348
Arg Ala Pro Lys Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ala	
430 435 440	
AAA AAT CCT GAA ATT TTG TCT AAG ACG GAG AGC CAA CTT GTG GAA GTA	1396
Lys Asn Pro Glu Ile Leu Ser Lys Thr Glu Ser Gln Leu Val Glu Val	
445 450 455	
GTT GAT CGT GAC CTC AGA AAA ATG CTT ATA AAA CCC AAA GCT CAA GAT	1444
Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Lys Pro Lys Ala Gln Asp	
460 465 470	
CCT CTT GTT GTG GGT GTG CGA GTA TGG CCA CAA GCT ATC CCA CAG TTT	1492
Pro Leu Val Val Gly Val Arg Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe	
475 480 485	
TTG GTT GGT CAT CTG GAT ACG CTA AGT ACT GCA AAA GCT GCT ATG AAT	1540

Leu Val Gly His Leu Asp Thr Leu Ser Thr Ala Lys Ala Ala Met Asn
490 495 500 505

GAT AAT GGG CTT GAA GGG CTG TTT CTT GGG GGT AAT TAT GTG TCA GGT 1588
Asp Asn Gly Leu Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ser Gly
510 515 520

GTA GCA TTG GGG AGG TGT GTT GAA GGT GCT TAT GAA GTT GCA TCC GAG 1636
Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Val Ala Ser Glu
525 530 535

GTA ACA GGA TTT CTG TCT CGG TAT GCA TAC AAA TGAAACCTGT GTTGGGGGTA 1689
Val Thr Gly Phe Leu Ser Arg Tyr Ala Tyr Lys
540 545

GTCCAAACCT TGTTAGTAGT ACGATCATGC CTTGGGAAAA TTGGCATGTG CCTAAAAGTT 1749
TTGCTCATTAGAGTTATTTT AGCCTTGGTA AATGATTTGT ACTTGATATC AGTCGTTTTTC 1809
TTTGAGATAA AATGTTTCCTG TTCAGGAAAT ATAATGTATA TCAATTTTAA AAAAAAAAAA 1869
AAAAA 1874

【書類名】

図面

【図1】

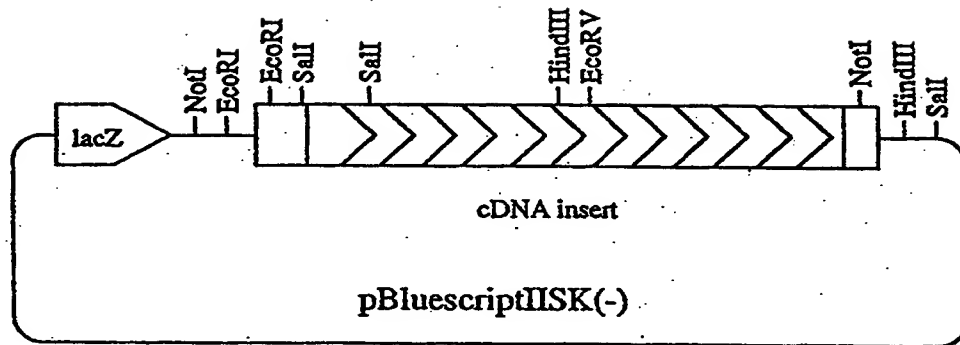


図1 pBNtPX-1の模式図

【図2】

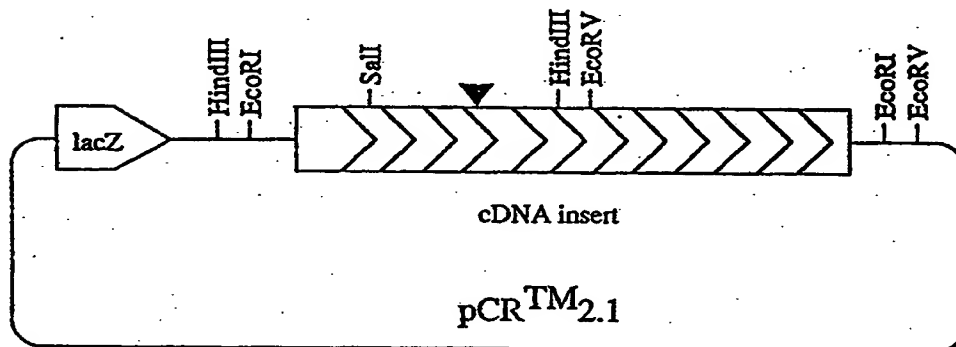


図2 pCR-HC及びpCR-RCの模式図

【図3】

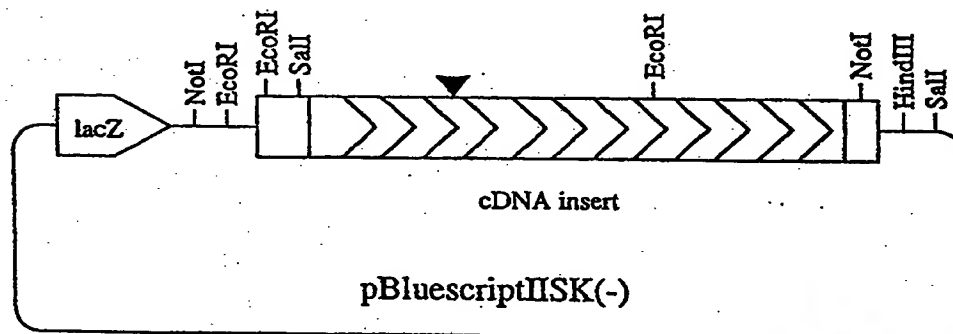


図3 pBAtPX-C及びpBAtPX-RCの模式図

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 高等植物由来の、光要求型除草剤に従来よりもはるかに高度に耐性なプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ、遺伝子、組換えベクター及び形質転換体の提供。

【解決手段】 配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、1個または複数個のアミノ酸の欠失、付加あるいは置換の認められるアミノ酸配列を有し且つ実質的にプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼと同等の酵素活性を有する光要求型除草剤耐性プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ、その誘導体。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成 9年 9月11日

【特許出願人】

【識別番号】 000232623

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋 1 丁目 2 番 5 号

【氏名又は名称】 日本農業株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100094802

【住所又は居所】 東京都港区芝四丁目 5 番 1 2 号 三田ハイツ 9 0 3
号 さへき国際特許商標事務所

【氏名又は名称】 佐伯 健児

【書類名】 手続補正書

【提出日】 平成 9年11月13日

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成 9年特許願第265084号

【発明の名称】 光要求型除草剤耐性新規プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ

【補正をする者】

【事件との関係】 特許出願人

【識別番号】 000232623

【郵便番号】 103

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋1丁目2番5号

【氏名又は名称】 日本農薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100094802

【郵便番号】 108

【住所又は居所】 東京都港区芝四丁目5番12号 三田ハイツ903号さへき国際特許商標事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 佐伯 健児

【電話番号】 03-5484-4544

【発送番号】

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 特許出願人

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【特許出願人】

【識別番号】 000232623

特平 9-265084

【郵便番号】 103

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋1丁目2番5号

【氏名又は名称】 日本農薬株式会社

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 手続補正書

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】
【識別番号】 000232623
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋1丁目2番5号
【氏名又は名称】 日本農業株式会社
【代理人】 申請人
【識別番号】 100094802
【住所又は居所】 東京都港区芝四丁目5番12号 三田ハイツ903
号 さへき国際特許商標事務所
【氏名又は名称】 佐伯 健児

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000232623]

1. 変更年月日 1990年 8月 9日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋1丁目2番5号

氏 名 日本農薬株式会社



7 1 1 1